6 月 June
2019, 62(6): 703 - 709

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

http://www.insect.org.cn
doi: 10.16380/j.kcxb.2019.06.006

CLARITY 组织透明化技术在蜜蜂肠道组织上的运用

张洋逸[1,#], 黄伟峰[1,#], 何 楠[1], 李佳欢[1], 陈文锋[2], 黄少康[1,*]

(1. 福建农林大学蜂学学院, 福州 350002; 2. 福州大学生命科学研究所, 福州 350108)

摘要:【目的】以西方蜜蜂 *Apis mellifera* 工蜂肠道为例探究组织透明化技术——丙烯酰胺交联替换脂质透明硬化成像/免疫染色/原位杂交兼容组织水凝胶(clear lipid-exchanged acrylamide-hybridized rigid imaging/immunostaining/*in situ* hybridization-compatible tissue-hYdrogel, CLARITY)在昆虫组织上的应用,确定 CLARITY 与荧光原位杂交(FISH)相结合在昆虫肠道组织透明化中的适用性。【方法】依照 CLARITY 技术操作程序,用水凝胶固定西方蜜蜂肠道,并以被动方式透明化,再用靶向东方蜜蜂微孢子虫 *Nosema ceranae* 16S rRNA 带异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记和靶向真核细胞 18S rRNA 带 Texas RED 标记的寡核苷酸荧光探针进行肠道组织的荧光原位杂交,然后用 DAPI(蓝色)进行细胞核复染,通过激光共聚焦显微镜观察透明化的染色组织。【结果】首次成功将西方蜜蜂肠道组织透明化。在激光共聚焦显微镜下,观察到马氏管的原始分布形态,以及东方蜜蜂微孢子虫在中肠末端分布更密集的空间分布特征,并实现了对肠道组织的 3D 重构。【结论】CLARITY 能应用于蜜蜂肠道组织透明化,透明化组织能进行原位杂交和激光共聚焦观察。CLARITY 和 FISH 相结合免除抗体制备和石蜡切片的麻烦,直观展示肠道内部的真实状态,为昆虫生理病理研究提供了一种可靠特异的标记方法。

关键词: 西方蜜蜂; 东方蜜蜂微孢子虫; 组织透明化技术; 肠道; 激光共聚焦显微镜; 原位杂交
中图分类号: Q965.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2019)06-0703-07

Application of CLARITY on honey bee gut tissues

ZHANG Yang-Yi[1,#], HUANG Wei-Fone[1,#], HE Nan[1], LI Jia-Huan[1], CHEN Wen-Feng[2], HUANG Shao-Kang[1,*] (1. College of Bee Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Institute of Life Sciences, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China)

Abstract:【Aim】This study aims to investigate whether clear lipid-exchanged acrylamide-hybridized rigid imaging/immunostaining/*in situ* hybridization-compatible tissue-hYdrogel (CLARITY) technique is feasible in insect tissue treatments, using guts of *Apis mellifera* workers as the test samples, and to test the feasibility of CLARITY in combination with fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in the clarification of insect gut tissues.【Methods】*A. mellifera* worker guts were fixed and solidified according to the regular CLARITY protocol and clarified using the passive method. The *in situ* hybridization of the clarified gut tissues was conducted using species-specific oligonucleotide probes including *Nosema ceranae*-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC) and a universal eukaryotic 18S rRNA-targeted oligonucleotide probe labeled with Texas RED. The nuclei were counter-stained with DAPI (in blue), and the stained tissues were observed under a confocal laser scanning microscope.【Results】For the first time, *A. mellifera* guts were successfully processed and

基金项目: 国家自然科学基金项目(31772681); 福建农林大学科研发展基金(KFA17245A); 福建农林大学蜂学学院创新团队基金(13290001003)

作者简介: 张洋逸, 男, 1994 年 8 月生, 四川成都人, 硕士研究生, 研究方向为蜜蜂科学, E-mail: 1624803210@qq.com; 黄伟峰, 男, 1978 年 12 月生, 台湾高雄人, 教授, 研究方向为蜜蜂健康与病理, E-mail: wfhuang@fafu.edu.cn

[#]共同第一作者 Authors with equal contribution

[*]通讯作者 Corresponding author, E-mail: skhuang@fafu.edu.cn

收稿日期 Received: 2019-01-11; 接受日期 Accepted: 2019-02-19

clarified. The original morphology of Malpighian tubules in the abdomen was observed, and the spatial distribution of *Nosema* with higher density at the distal part of the midgut was clearly labeled in the 3D scanning using confocal laser scanning microscope.【Conclusion】CLARITY can be used in the clarity of honey bee gut tissues, and the clarified gut tissues can be stained by FISH and observed with confocal laser scanning microscopy. CLARITY in combination with FISH provides a reliable and specific labeling method for insect physiological and pathological studies without the troubles of antibody preparation and paraffin sectioning usually required for a similar study.

Key words: *Apis mellifera*; *Nosema ceranae*; CLARITY; gut; confocal laser scanning microscopy; *in situ* hybridization

组织结构信息对于组织器官的功能研究有重要意义。组织切片技术是经典的组织结构研究手段，但组织切片技术有一定局限:首先，由于组织成分复杂，不同成分的折光率差异大，光学不透明，一般显微观察的组织深度仅有几微米，大的组织必须经过切片处理后才能进一步观察，破坏了组织的完整性；同时，切片的剪切力不可避免地造成组织撕裂和扭曲，影响了组织形态的准确性(王培新等, 2016; 李瑛泽等, 2018)，基于组织切片的三维组织重构也存在信息失真的问题。其次，组织切片过程的化学处理与下游免疫组化或原位杂交等技术兼容性差，导致一些特征信息获取困难。因此，人们一直在努力探索完整组织的深度观察技术，并获得了突破性进展(欧毅超等, 2018)。

Chung 等(2013)在《Nature》上发文报道了一种称为丙烯酰胺交联替换脂质透明硬化成像/免疫染色/原位杂交兼容组织水凝胶(clear lipid-exchanged acrylamide-hybridized rigid imaging/immunostaining/*in situ* hybridization-compatible tissue-hYdrogel, CLARITY)的组织透明化技术，他们利用以丙烯酰胺为主体的水凝胶替换组织中的脂质，使组织内物质折光率趋于统一，实现组织的光学透明；再结合免疫组化或原位杂交技术，在激光共聚焦显微镜下，成功观察到小鼠脑内的神经细胞分布、亚细胞结构、蛋白质、核酸等大分子分布；获得了详实的三维信息，实现了全脑3D形态的无损观察，对靶标实现空间定位，组织观察深度甚至超过激光共聚焦物镜最大工作距离 8 mm，大大提高显微分辨率。除脑、脊髓等神经组织外，该技术还成功应用于植物叶片、骨骼、肌肉等其他组织的透明化研究(Chung *et al*., 2013; Tomer *et al*., 2014; Palmer *et al*., 2015; 王培新等, 2016; Greenbaum *et al*., 2017; Zhang *et al*., 2018)。

蜜蜂在农作物授粉方面有不可替代的作用，是重要的社会性昆虫，也是重要的模式昆虫。我们以蜜蜂肠道组织为例，将 CLARITY 技术首次应用于昆虫组织透明化，建立了蜜蜂肠道组织透明化的技术流程，并结合荧光原位杂交技术，成功观察到感染蜜蜂肠道的东方蜜蜂微孢子虫 *Nosema ceranae* 的实际分布状态。该技术的成功应用，打开了昆虫学领域组织透明化技术的大门，为人们研究与观察昆虫组织内部变化提供了新的手段。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫的获取

西方蜜蜂 *Apis mellifera* 由福建农林大学蜂学学院实验蜂场提供。从蜂群中随机捕捉 10 头工蜂，放入室内饲养盒，供以 50% 质量分数的蔗糖液，饲喂 2 d，以减少肠道内的花粉对观察的干扰。

1.2 丙烯酰胺水凝胶固定液的配制

丙烯酰胺水凝胶固定液的配制方法参照 Chung 等(2013)、Tomer 等(2014)和 Epp 等(2015)的方法，其中所用磷酸缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)参照 Silva-Zacarin 等(2012)按如下配方配制: 128 mmol/L NaCl, 16.7 mmol/L Na_2HPO_4, 20 mmol/L KH_2PO_4, pH 7.4。

具体配制方法:取丙烯酰胺水溶液(40%) 30 mL，甲叉双丙烯酰胺水溶液(2%) 5 mL, VA-044 热引发剂 1 g, 多聚甲醛溶液(16%) 100 mL, 10 × PBS 40 mL, 蒸馏水 225 mL, 预冷后冰上混合，溶解，配制成 400 mL 丙烯酰胺水凝胶固定液，4℃保存待用或 -20℃分装储存。

1.3 蜜蜂肠道组织透明化处理

蜜蜂肠道组织透明化方法参照 Chung 等(2013)，稍做调整:(1)抽气:制样前，将工蜂置于小管中，冰上冻晕，剪下腹部，装入 5 mL 离心管，加入冰浴的 10 倍样本体积的丙烯酰胺水凝胶固定液(1.2 节制备)；将管盖打开，放入抽气瓶中抽真空

（WX-2 型无油真空泵，中国临海谭氏真空设备有限公司），抽气 10 次，每次 1 min，每次间隔 30 s，以抽除蜜蜂腹部气囊内的气体。固定液全程置于冰上。（2）固定与透明化：抽气完成后，样本管于 4℃ 孵育 3 d，每 24 h 更换一次固定液。然后，固定液上加入 500 μL 矿物油隔绝空气，放入水浴锅内 37℃ 孵育 3 h。丙烯酰胺初步聚合后取出工蜂腹部，在体视显微镜（SZ680 连续变倍体视显微镜，重庆奥特光学仪器有限公司）下去除腹部体壁，剪下肠道，放入盛有 10 倍体积洗涤液的小管内[0.2 mol/L 硼酸，4% 十二烷基硫酸钠（SDS），pH 8.5]，200 r/min 37℃ 恒温振荡（ZHWY-103D 恒温培养振荡器，上海精宏实验设备有限公司），以洗脱样本中残留的丙烯酰胺单体，每 24 h 更换一次洗涤液，持续振荡清洗 15 d，至样本透明。（3）洗脱：样本透明化后，为洗脱样本中过量的 SDS，使用 PBST 溶液（1 × PBS，0.1% Triton X-100）室温清洗样本 3 次；其中前 2 次各清洗 1 h，第 3 次清洗过夜。清洗后的透明样本可长期保存于 4℃ 的 PBST 溶液中。

1.4　透明工蜂肠道组织的原位杂交与染色

参照 Gisder 等（2011）的方法进行组织原位杂交和染色。靶向东方蜜蜂微孢子虫 16S rRNA 的异硫氰酸荧光素（fluorescein isothiocyanate，FITC）荧光探针（5′ FITC-CTCCCAACTATACAGTACACCTCATA-3′）和靶向真核生物 18S rRNA 的 Texas Red 荧光探针（5′TexRed-ACCAGACTTGCCCTCC-3′）委托上海生物工程有限公司合成；再将两种探针均配制成 1.8 μmol/μL 的浓度用于原位杂交。

原位杂交：使用杂交液（20% 甲酰胺，0.9 mol/L NaCl，20 mmol/L Tris-HCl，0.01% SDS，pH 7.9）将 1.3 节的样本清洗 3 次，前 2 次清洗 10 min，第 3 次清洗过夜，使得杂交液浸入样本。过夜后的样本管，放入 46℃ 恒温水浴（DKZ-2 型电热恒温震荡水槽，上海精宏实验设备有限公司）预热，1 h 后，将样本转移到约 10 倍样本体积的含两种荧光探针的预热杂交液中，46℃ 避光振荡孵育过夜。

细胞核染色：探针杂交后的样本，使用 10 倍样本体积的 PBS 静置清洗 3 次，每次 10 min。然后将样本转移到 1 μg/mL 的 DAPI 染色液中，避光孵育 10 min。再用 PBS 清洗 3 次，每次 10 min，然后将样本转移到盛有抗荧光衰减封片剂（北京索莱宝科技有限公司）的小管中，避光保存，待用。

1.5　探针标记肠道的激光共聚焦显微镜观察

取 35 mm 玻底培养皿，滴入少量抗荧光衰减封片剂，然后将染色处理好的样本放入玻底培养皿底部，盖上盖片，置于激光共聚焦显微镜（Leica TCS SP8X DLS 白激光光片显微镜，Leica Microsystems，德国）下，分别选择激发波长 405 nm（DAPI），488 nm（FITC）和 595 nm（Texas Red）对透明化肠道进行观察，对马氏管、肠道细胞以及感染中肠细胞的东方蜜蜂微孢子虫等进行仔细观察和拍照。

为了观察到肠道整体状态，我们使用 10 倍物镜对样本不同区域进行观察和拍摄，每个区域拍摄 3 个深度，共 0.07 mm，并将 3 个深度的荧光信号叠加，再利用软件将不同区域图片拼接，以展示出样本整体的染色状况。在 20 倍物镜下，选择样本区域（775 μm × 775 μm，深度 224 μm），以 600 Hz 的扫描速度对样本进行逐层扫描，再用软件 LAS X 3.1.1.15751 将 113 张扫图构建样本 3D 模型。在 60 倍物镜下对感染了东方蜜蜂微孢子虫的中肠细胞进行了观察和拍照。

2　结果

2.1　蜜蜂肠道组织透明化样本的显微观察

西方蜜蜂工蜂腹部经丙烯酰胺水凝胶固定后，取出，于体视显微镜下，用镊子小心地剥去腹部体壁，可见肠道呈自然的卷曲状，组织为不透明的水白色，无法透过组织观察下方黑色参照线（图 1：A）；经过 SDS 透明化处理 15 d 后，获得透明化的肠道（图 1：B），透明效果显著。说明 CLARITY 也可应用于蜜蜂肠道组织的透明化处理。

2.2　原位杂交透明化肠道的激光共聚焦显微镜观察

透明化的西方蜜蜂工蜂肠道经 DAPI 染色后，在 405 nm 激发光下，可见透明化组织内呈现蓝色的马氏管管壁细胞的细胞核，呈条状分布，显现出马氏管在腹部内的自然分布形态（图 2：A）。在 488 nm 激发光下，可见中肠中被绿色荧光探针标记的东方蜜蜂微孢子虫，在中肠后部分布较为密集，绿色成片，说明感染严重；中肠前、中部虽有分布，但密度不如后部，感染相对较轻；而回肠起始部分均无微孢子虫感染（图 2：B），说明该微孢子虫对中肠组织感染的特异性；这一结构在普通切片样本中难以观察，而在透明化和 FISH 处理的肠道中则清晰可见。在 595 nm 激发光下，可见整个中肠及马氏管均呈红色，说明靶向真核生物 18S rRNA 寡核苷酸探针较好地结合到马氏管及中肠细胞内的靶标，不仅中肠

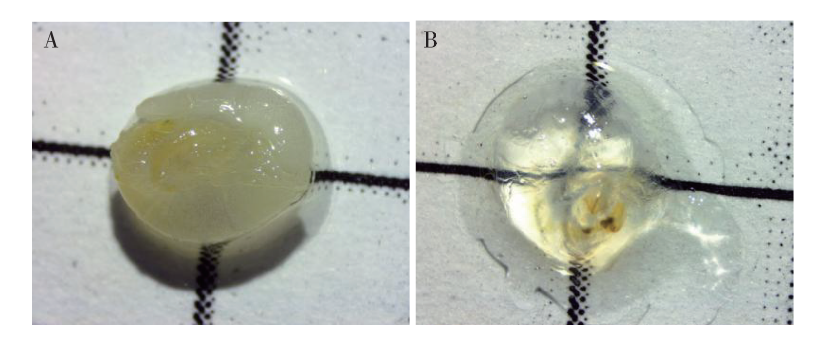


图 1 体视显微镜下西方蜜蜂工蜂肠道透明化处理前(A)与处理后(B)的形态

Fig. 1 Intact gut of *Apis mellifera* worker before (A) and after (B) clarity under stereo microscope

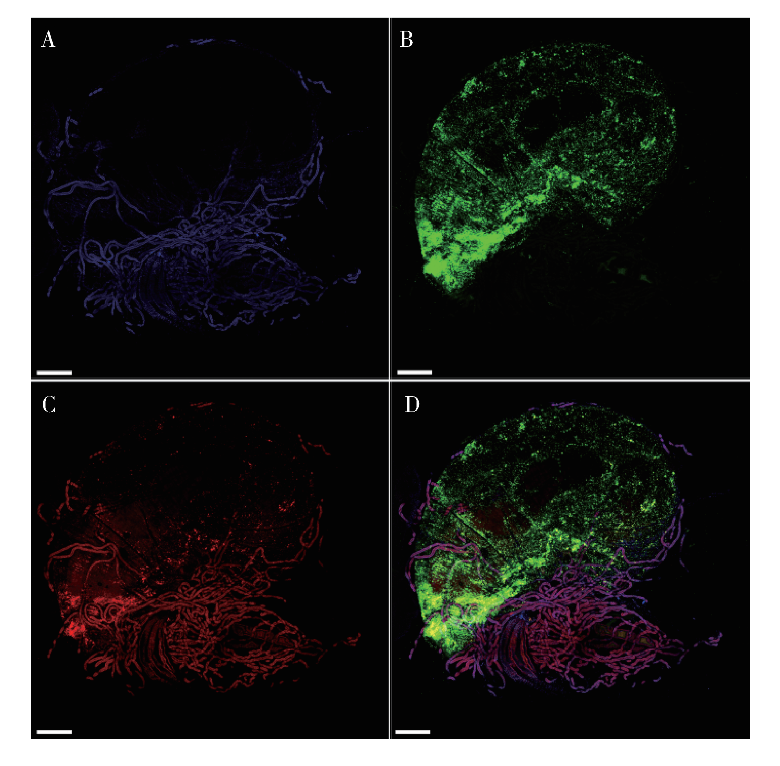


图 2 荧光原位杂交后的透明化西方蜜蜂工蜂肠道激光共聚焦显微镜观察

Fig. 2 Clarified gut of *Apis mellifera* workers after species-specific fluorescence *in situ* hybridization (FISH) observed with confocal laser scanning microscopy

A: DAPI 染色(蓝色)后呈现出西方蜜蜂腹部马氏管的分布 Distribution of Malpighian tubules of *A. mellifera* stained with DAPI (in blue); B: FITC 标记的特异寡核苷酸探针(绿色)原位杂交显示东方蜜蜂微孢子虫在西方蜜蜂工蜂中肠中的感染分布状态 Distribution of *Nosema ceranae* in midgut of infected *A. mellifera* workers after FISH using species-specific oligonucleotide probe labeled with FITC (in green); C: Texas Red 标记的 18S rRNA 真核生物寡聚核苷酸探针(红色)原位杂交后显示的西方蜜蜂马氏管和中肠 Morphology of Malpighian tubules and midgut of *A. mellifera* after FISH using 18S rRNA eukaryotic cell oligonucleotide probe labeled with Texas Red (in red); D: A, B 和 C 叠合图,东方蜜蜂微孢子虫呈绿色,西方蜜蜂马氏管呈紫红色,中肠呈暗红色 Overlay image of A, B and C, with *N. ceranae* spores in green, Malpighian tubules of *A. mellifera* in fuchsia, and midgut in kermesinus. 标尺 Scale bars = 500 μm.

的轮廓明显,而且也清晰地显示了马氏管基部与回肠起始部位的横纹褶皱(图 2: C)。从着色效果来看,马氏管细胞比中肠细胞着色效果都更好,这可能与马氏管结构简单,管壁比中肠壁薄,探针渗透和杂交效果好有关。3 个染色通道的图像叠合后,可清晰看到中肠中东方蜜蜂微孢子虫在肠道内的空间分布,马氏管在腹部内的形态也一目了然(图 2: D)。

将 20 倍物镜下逐层扫描的原位杂交透明化西方蜜蜂肠道图像构建 3D 图(图 3)。由图可见,附着于西方蜜蜂中肠外的马氏管管壁细胞核呈蓝色,排列紧密,条状明显(图 3: A);中肠细胞内的东方蜜蜂微孢子虫被染成绿色,显示中肠被微孢子虫广泛感染(图 3: B);而中肠细胞与马氏管细胞等均被染成红色(图 3: C),叠合的 3D 图中马氏管、东方蜜蜂微孢子虫、中肠细胞空间分布明显,可清晰区分(图 3: D)。

经东方蜜蜂微孢子虫特异的核酸探针染色后的

透明化西方蜜蜂工蜂中肠，在激光共聚焦显微镜下，可清晰见到感染中肠细胞的微孢子虫发出绿色荧光，密集分布在细胞质中，细胞核中没有分布，二者边界明显（图 4）。

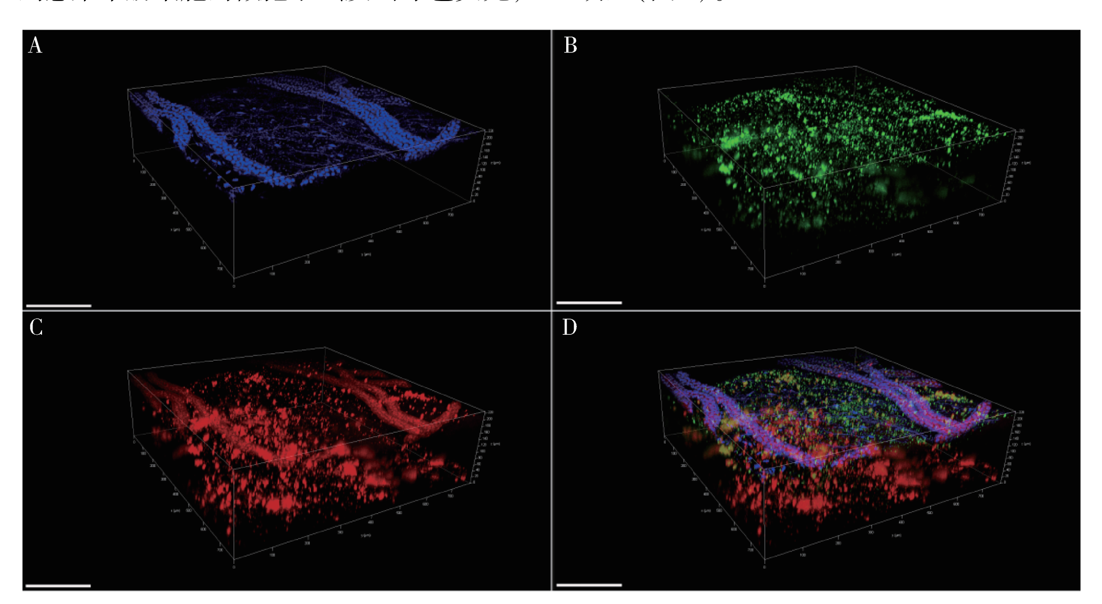


图 3　透明化西方蜜蜂工蜂部分肠道的激光共聚焦显微图像 3D 重构

Fig. 3　3D reconstruction of the clarified partial gut of *Apis mellifera* worker by confocal laser scanning microscopy

A：DAPI 染色（蓝色）的西方蜜蜂马氏管 Malpighian tubules of *A. mellifera* stained with DAPI (in blue)；B：FITC 标记的特异寡核苷酸探针（绿色）原位杂交显示东方蜜蜂微孢子虫在西方蜜蜂中肠中的感染 Infection of *Nosema ceranae* in *A. mellifera* midgut after FISH by species-specific oligonucleotide probe labeled with FITC (in green)；C：Texas Red 标记的真核生物 18S rRNA 寡聚核苷酸探针原位杂交后显示西方蜜蜂中肠和马氏管（红色）Midgut and Malpighian tubules (in red) of *A. mellifera* after FISH by eukaryotic 18S rRNA oligonucleotide probe labeled with Texas Red. D：A，B 和 C 叠合图 Overlay image of A，B and C. 标尺 Scale bars = 200 μm.

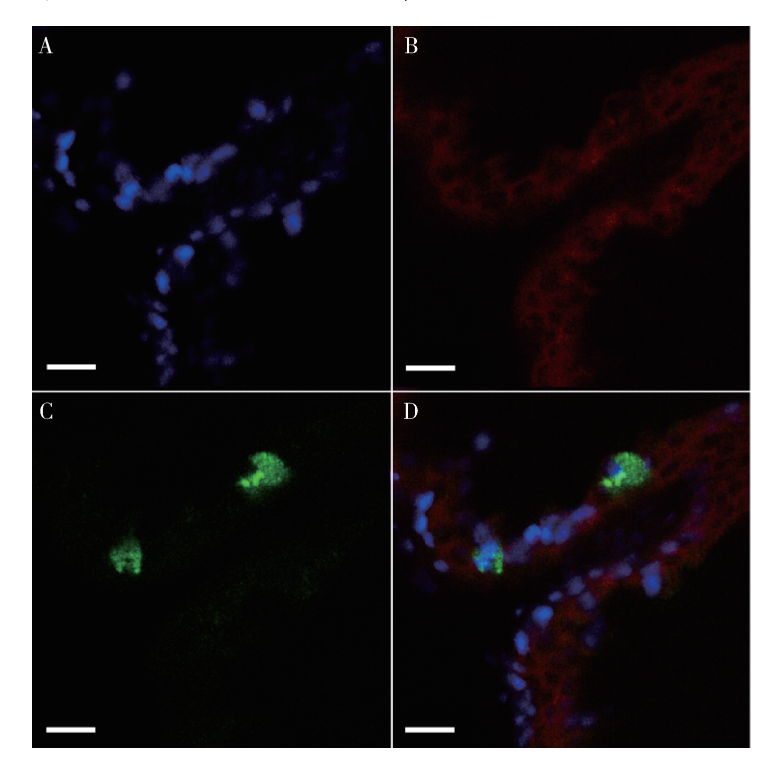


图 4　西方蜜蜂工蜂中肠细胞中的东方蜜蜂微孢子虫激光共聚焦显微镜观察

Fig. 4　*Nosema ceranae* in midgut cells of infected *Apis mellifera* worker observed with confocal laser scanning microscopy

A：西方蜜蜂中肠细胞内的细胞核（蓝色）Midgut cell nuclei (in blue) of *A. mellifera*；B：带红色荧光的西方蜜蜂中肠细胞的细胞质（红色）Cytoplasma (in red) of midgut cells of *A. mellifera* with red fluorescence；C：感染西方蜜蜂中肠细胞细胞质中的东方蜜蜂微孢子虫（绿色）*N. ceranae* spore (in green) in cytoplasma of infected midgut cells of *A. mellifera*；D：A，B 和 C 叠合图 Overlay image of A，B，and C. 标尺 Scale bars = 20 μm.

3 讨论

组织透明化技术由于其突出的无损形态以及深度的组织观察和拍摄的优势，已成功运用于小鼠脑、肝、肾、肺等多种组织的研究（欧毅超等，2018）。我们以西方蜜蜂工蜂为样本，首次将该技术在昆虫上应用，成功获得了透明化的工蜂肠道组织，并通过原位杂交结合共聚焦显微技术，观察到工蜂腹部整体的内部原始形态，马氏管、中肠肌纤维、回肠起始部位、中肠及感染其中的东方蜜蜂微孢子虫等空间位置形态得到清晰展示。观察到工蜂中肠后部东方蜜蜂微孢子虫的感染明显较前部更为严重，这一现象与 Fries（1988）对西方蜜蜂微孢子虫 *N. apis* 感染工蜂的中肠切片电镜观察结果一致。

为了适应成年工蜂腹部样本的处理，我们对透明方案做了几方面的微调：

（1）腹部整体处理，保证内部结构的原始形态。已有的组织透明化技术一般是先解剖取出组织，再用水凝胶固定。但对于柔软组织（如脑）的解剖要求娴熟的技术，否则易造成组织的损伤，影响形态的完整性。为此，在制样过程中，我们直接将整个工蜂腹部放在固定液中固定，由于有体壁的保护，内部形态保存完整；剥离体壁后，获得的腹部组织能真实展现。（2）蜜蜂腹部有大量气囊与气管，里面的空气会阻碍固定液的渗入。我们通过抽气的方式消除了气体对固定和透明化的影响，获得良好效果。另外，Sylwestrak 等人采用抽气并充氮气的方式消除空气中氧气对固定的影响（Sylwestrak *et al.*，2016）。由于充氮气需要特殊设备，操作也麻烦，用适量矿物油隔离空气，可取得同样的效果。（3）排空中肠，减少花粉等自发光干扰。在共聚焦显微镜观察时，在 405 nm（DAPI）和 488 nm（FITC）的激发波长下，肠道和气管的几丁质以及肠腔中的花粉壳均会发出不同强度的自发荧光。在 FITC 的激发波长下，花粉壁会发出绿色荧光，干扰了绿色荧光探针标记的微孢子虫的观察。因此，应尽量减少中肠内花粉，我们将抓取的工蜂放在室内饲养盒用糖水饲养 2 d，待中肠内的花粉排入后肠，使中肠有一个清晰的观察环境。同时，由于花粉粒径远大于微孢子虫孢子，形状也显著不同，个别残留的花粉呈空心圆形，而孢子更小，呈椭圆，易于区分。并且，花粉在 595 nm（Texas Red）的激发波长无明显自发荧光，所以，通过与 FITC 通道的图像进行对比，可排除花粉的干扰。另外，为了避免几丁质产生自发光，可降低激发光的强度，使几丁质不显色，再进行目标组织的观察。

在试验过程中，仍有一些问题有待进一步探索和改进：（1）细胞核染色时间需要根据样本进行调整。我们对样本的 DAPI 染色时间仅用了 10 min，能很好地对马氏管细胞核进行染色；但中肠比较厚，染色效果不理想，因此，中肠细胞的核染色应延长染色时间。（2）在透明化工蜂肠道样本时，发现幼龄工蜂的样本顺利透明化，而老龄工蜂的样本透明程度不佳。这可能与微孢子虫在肠细胞内大量繁殖，降低透光率有关，但尚待进一步研究确定。

尽管本次试验用的是蜜蜂肠道组织，但由于昆虫等节肢动物的肠道组织具有较大的相似性，因此，本研究获得的改进方法可适用于其他昆虫肠道组织透明化。需要注意的是，不同组织的大小、膜脂含量、致密度等均有差异，对于水凝胶的交联度，透明化中各步骤的时间等条件，要进行适当调整，才能达到更满意的效果（Epp *et al.*，2015；Krolewski *et al.*，2017；代全楷等，2018）。我们用此技术，也获得了透明化的蜜蜂脑等其他组织。因此，该方法也基本适用于其他昆虫组织的透明。另需要注意的是，随着透明时间延长，组织中的核酸会逐渐流失，因此，不能透明过长时间，否则会导致靶标丢失，使后期的染色标记失败。

目前，组织透明化技术还在不断改进和发展过程中，在如何提高透明程度，缩短处理时间，优化成像质量等方面仍在不断提高（Epp *et al.*，2015；Krolewski *et al.*，2017）；但以 CLARITY 等为代表的组织透明化技术在组织样本制备方面仍具有革命性的意义。它实现了在不破坏组织完整性的前提下，显著提高显微观察深度和分辨率，为组织器官功能研究提供了新手段，在昆虫研究领域必将会得到更广泛的应用。

参考文献（References）

Chung K, Wallace J, Kim SY, Kalyanasundaram S, Andalman AS, Davidson TJ, Mirzabekov JJ, Zalocusky KA, Joanna M, Denisin AK, Pak S, Bernstein H, Ramakrishnan C, Grosenick L, Gradinaru V, Deisseroth K, 2013. Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature*, 497(7449): 332–337.

Dai QK, He JB, Lian F, Ming ZY, Ju JN, Li KZ, Wu GB, 2018. Comparison of application efficacy among four hydrogels with different concentrations in mouse brain, liver and kidney tissues clearing. *Guangxi Med. J.*, 40(21): 2567–2570. [代全楷，何

剑波，连芳，明志勇，鞠佳霓，李科志，邬国斌，2018．4 种不同浓度的水凝胶在小鼠脑、肝、肾组织透明化中的应用效果比较．广西医学，40(21)：2567 – 2570]

Epp JR，Niibori Y，Hsiang HL，Mercaldo V，Deisseroth K，Josselyn SA，Frankland PW，2015．Optimization of clarity for clearing whole-brain and other intact organs．*eNeuro*，2(3)：e0022．

Fries I，1988．Infectivity and multiplication of *Nosema apis* Z．in the ventriculus of the honey bee．*Apidologie*，19(3)：319 – 328．

Gisder S，Mockel N，Linde A，Genersch E，2011．A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important honey bee-pathogenic microsporidia．*Environ．Microbiol．*，13(2)：404 – 413．

Greenbaum A，Chan KY，Dobreva T，Brown D，Balani DH，Boyce R，Kronenberg HM，McBride HJ，Gradinaru V，2017．Bone CLARITY：clearing，imaging，and computational analysis of osteoprogenitors within intact bone marrow．*Sci．Transl．Med．*，9 (387)：eaah6518．

Krolewski DM，Kumar V，Martin B，Tomer R，Deisseroth K，Myers RM，Schatzberg AF，Lee FS，Barchas JD，Bunney WE，Akil H，Watson SJJr，2017．Quantitative validation of immunofluorescence and lectin staining using reduced CLARITY acrylamide formulations．*Brain Struct．Funct．*，223(2)：987 – 999．

Li YZ，Shao ZH，Li SG，2018．Application of clearing methods on tissues in the three-dimensional imaging research．*Acta Anat．Sin．*，49(3)：400 – 405．[李瑛泽，邵志华，李思光，2018．组织器官透明化技术在三维成像研究中的应用．解剖学报，49(3)：400 – 405]

Ou YC，Feng ZP，Wu GS，Zhang Y，Bao Y，Qiu BH，Liu YW，Qi ST，2018．Comparison of transparent effects of six different optical clearing methods on rat brain tissues．*Chin．J．Comp．Med．*，28 (4)：7 – 14．[欧毅超，冯展鹏，武广森，张源，包赟，邱炳辉，刘亚伟，漆松涛，2018．6 种光学透明化方法在大鼠脑组织块的透明效果比较．中国比较医学杂志，28(4)：7 – 14]

Palmer WM，Martin AP，Flynn JR，Reed SL，White RG，Furbank RT，Grof CP，2015．PEA-CLARITY：3D molecular imaging of whole plant organs．*Sci．Rep．*，5(1)：13492．

Silva-Zacarin ECM，Chauzat MP，Zeggane MPS，Drajnudel P，Schurr F，Faucon JP，Malaspina O，Engler JA，2012．Protocol for optimization of histological，histochemical and immunohistochemical analyses of larval tissues：application in histopathology of honey bee．In：Méndez-Vilas A ed．Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology．Formatex Research Center，Badajoz．696 – 703．

Sylwestrak EL，Rajasethupathy P，Wright MA，Jaffe A，Deisseroth K，2016．Multiplexed intact-tissue transcriptional analysis at cellular resolution．*Cell*，164(4)：792 – 804．

Tomer R，Ye L，Hsueh B，Deisseroth K，2014．Advanced clarity for rapid and high-resolution imaging of intact tissues．*Nat．Protoc．*，9 (7)：1682 – 1697．

Wang PX，Zhang D，Shang AJ，Hou B，2016．Tissue clarifying techniques．*Chin．J．Neuroanat．*，32(1)：124 – 128．[王培新，张丹，尚爱加，侯冰，2016．组织透明化技术．神经解剖学杂志，32(1)：124 – 128]

Zhang WL，Liu SH，Zhang WC，Hu W，Jiang M，Tamadon A，Feng Y，2018．Skeletal muscle CLARITY：a preliminary study of imaging the three-dimensional architecture of blood vessels and neurons．*Cell J．*，20(2)：132 – 137．

（责任编辑：马丽萍）